تاثیر دو نوع هورمون بر تولید برگ‌های حاوی پایه جوانه در روش باززایی مستقیم گیاه چغندرقند

The Influence of Two Types of Hormones (BA and NAA) on Appearance of Shoot Base Explants in Sugar Beet *(Beta vulgaris* L. *)*

میترا خادمی[۱] و فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۰۱

چکیده

به‌منظور مطالعه‌ی سطوح هورمونی مناسب برای تولید برگ‌های حاوی پایه جوانه در روش باززایی مستقیم در گیاه چغندرقند، یک آزمایش فاکتوریل ۲×۴×۴ با ۳۲ تیمار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و در هر تکرار ۱۰ ریزنمونه انجام گرفت. از جوانه انتهایی گیاهچه‌های ۱۰روزه به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. فاکتورها سطوح غلظتی هورمون‌های بنزیل‌آدنین (BA) (۰، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (NAA) (۰، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و دو لاین چغندرقند (SBSI-04 و SBSI-02) بودند. پس از گذشت دو هفته، ریزنمونه‌ها به محیط ثابت با ترکیب هورمونی NAA (۰/۱میلی‌گرم در لیتر) و BA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از سه هفته، تعداد جوانه‌های تولیدی شمارش و مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج این آزمون نشان داد که بیشترین جوانه تولیدی در لاین‌های SBSI-04 و SBSI-02 به‌ترتیب در سطوح هورمونی ۲mg/l و ۱/۵ mg/l از بنزیل‌آدنین (BA) تولید شدند. همچنین از نظر صفت تعداد جوانه به برگ، لاین SBSI-04 در سطح ۲ mg/l و در مرتبه بعدی لاین SBSI-02 در سطح mg/l ۱/۵ هورمون BA بیشترین جوانه‌ها را تولید نمودند. به‌طورکلی لاین SBSI-04 بیشترین قابلیت القاء جوانه بر روی برگ را نشان داد ولی در مجموع هر دو ژنوتیپ برای باززایی بسیار مناسب تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: جوانه انتهایی، کشت‌بافت، کارآیی تراریزش، اکسین، سیتوکینین

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۲. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد
*: نویسنده مسوول Email: Nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی دنیا و ایران است به طوری که حدوداً ۴۰-۳۵ درصد شکر دنیا را تأمین می‌کند (Mishutkina *et al*., 2010). در ایران چغندرقند با بیشترین عملکرد نسبت به سایر گیاهان صنعتی، در جایگاه نخست قرار دارد (Anonymous, 2007). به دلیل قابلیت عملکرد بالای آن، نه تنها به‌عنوان منبع شکر، بلکه به‌عنوان یک بیوراکتور سبز برای ذخیره متابولیت‌های جدید در ریشه به‌طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه قرار گرفته است (Sevenier *et al*., 1998; Menzel *et al*., 2003) بهبود بسیاری از صفات زراعی به‌دلیل وضعیت بیولوژیکی خاص چغندرقند، مثل دوساله بودن، آلوگامی، خودناسازگاری و همچنین بهبود مقاومت به حشرات مضر به‌دلیل محدود بودن منابع ژنتیکی مقاومت به آفات، عدم‌تنوع ژنتیکی کافی در ژرم‌پلاسم و سیستم چندژنی مقاومت از طریق به‌نژادی کلاسیک چندان موفقیت‌آمیز نبوده است و یا حداقل با مشکلات بسیاری همراه بوده است (Ivic-Haymes and Smigocki, 2005b; Sharma *et al*., 2000) یکی از عمده‌ترین نیازهای هر سیستم انتقال ژن، بهره-مندی از یک روش باززایی و تولید گیاهچه به کمک کشت بافت است. مروری بر اطلاعات موجود نشان می‌دهد که یکی از موانع مهم در تراریزش این گیاه میزان کم‌باززایی مستقیم گیاه تراریخته از قطعات ریزنمونه می‌باشد. عمده‌ترین علل چنین رفتاری ممکن است ناشی از محدودیت ریزنمونه‌ها، میزان باززایی کم و وابسته بودن تولید گیاهچه‌ها به ژنوتیپ باشد (Saunders, 1982; Brears *et al*., 1989; Lindesy *et al*., 1990; Ehlers *et al*., 1991; Joersbo *et al*., 1996). انتخاب ریزنمونه به‌منظور انجام تراریزش و افزایش درصد باززایی گیاه، یکی از مهم‌ترین فاکتورهای موفقیت در کشت‌بافت و به دنبال آن تراریختی این گیاه است (Alt-Morbe *et al*., 1989; Bidney *et al*., 1992; Hoekema *et al*., 1993; Hiei *et al*., 1997; Komari *et al*., 1996; Neuerby *et al*., 1997; Klee, 2000; Ivic-Haymes *et al*., 2001) ریزنمونه‌های مختلفی از جمله کوتیلدن (Joersbo *et al*., 1998; Norouzi *et al*., 2005)، هیپوکوتیل (Jacq *et al*., 1993)، کالوس جنین‌زا (Snyder *et al*., 1999; Zhang *et al*., 2001a)، برگ (Wozniak and Owens, 1994; Connor-Ward and-Hinchee, 2001) برای تراریزش چغندرقند استفاده شده است. اکثراً باززایی گیاه از این ریزنمونه‌ها به‌صورت غیرمستقیم و شامل فاز کالوس بوده است که این امر در پاره‌ای از مواقع باعث ایجاد تنوع سوماکلونی می‌شود به همین‌منظور از روش باززایی مستقیم به‌دلیل سهولت تهیه ریزنمونه، کاهش زمان و قابلیت باززایی بالا استفاده می‌شود. در همین راستا *بخیت و سلیمان* (Bekheet and Solliman, 2007) از ریزنمونه برگ و جوانه انتهایی برای باززایی به روش مستقیم و غیرمستقیم در حضور هورمون‌های مختلف سیتوکینین و اکسین استفاده کردند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که بالاترین باززایی در روش مستقیم از ریزنمونه جوانه انتهایی با ٪۹۳ و ریزنمونه برگ در روش غیرمستقیم با ٪۸۰ حاصل شد. از آنجایی که امروز تحقیقات مهندسی ژنتیک فراوانی روی این گیاه در داخل کشور صورت می‌گیرد و معرفی یک روش باززایی کارآمد مستلزم استفاده از لاین‌های پدری و مادری معرفی شده توسط مؤسسه چغندرقند کشور است، در این تحقیق، برای تولید برگ‌های حاوی پایه جوانه برای انجام باززایی مستقیم و تأثیر ترکیبات هورمونی مختلف و ژنوتیپ گیاه بر فراوانی جوانه‌ها در گیاه چغندرقند، از دو لاین اصلاح شده‌ی SBSI-04 و SBSI-02 چغندرقند استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق به‌ترتیب از دو لاین مولتی‌ژرم و مونوژرم چغندرقند به نام‌های SBSI-04 (لاین گرده‌افشان) و SBSI-02 (لاین اوتایپ) استفاده شد که از آن‌ها به‌عنوان بهترین لاین-های والدی برای تولید بذر هیبرید در کشور استفاده می‌شود. برای تولید گیاهچه‌های استریل، از روش *نوروزی* و همکاران (Norouzi *et al*., 2005) با اندکی تغییرات به شرح زیر استفاده شد. در ابتدا، بذور جهت حذف زوائد و تسریع در جوانه‌زنی در محلول اسیدسولفوریک غلیظ به‌مدت ۳۰ دقیقه تیمار گردید. سپس بذور ۳ مرتبه و هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با آب معمولی شستشو و سپس در الکل ٪۷۰ به‌مدت ۱ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از شستشو با آب مقطر، بذور با محلول هیپوکلریت‌سدیم ٪۲/۵ به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و بار دیگر برای زدودن باقیمانده‌ی مواد ضدعفونی‌کننده، ۳ بار با آب‌مقطر هر بار به‌مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. بذرها جهت ریشه‌دار شدن بر روی کاغذ صافی استریل درون پتری‌دیش در تاریکی قرار داده شدند. بعد از ۲ روز بذور ریشه‌دار به محیط آب آگار برای تولید گیاهچه منتقل شدند. پس از گذشت یک هفته، قسمت کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه بذور جوانه‌زده حذف شد و جوانه انتهایی جهت تولید گیاهچه و برگ جوانه در محیط مصنوعی شامل محیط پایه MS (Murashing and Skoog, 1962) با ترکیبات سطوح غلظتی هورمون‌های BA (۰، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱

میلی‌گرم در لیتر) با ۱۶ ترکیب هورمونی در دو لاین چغندرقند و در مجموع با ۳۲ تیمار کشت شدند. تیمارها در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۱۰ جوانه رأسی در هر تکرار با همدیگر مقایسه شدند. پس از گذشت ۱۰ تا ۱۴ روز، جوانه‌ها در محیط‌کشت پایه MS با ترکیبات هورمونی BA (۰/۲۵ mg/l) و IBA (۰/۱mg/l) به مدت چهار هفته و هر دو هفته یک بار واکشت شدند. تعداد جوانه‌های تولیدی، تعداد برگ‌ها و درصد جوانه به برگ در هر یک از تیمارها شمارش گردیدند. صفات تعداد جوانه به تعداد کل برگ، تعداد برگ و همچنین تعداد جوانه‌های گیاهچه به تعداد کل جوانه‌ها پس از آزمون توزیع نرمال داده‌ها به کمک نرم‌افزار MSTSTC (Nissen, 1989) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح معنی‌دار مربوط برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج

همان‌طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که هورمون BA به تنهایی اثر معنی‌داری روی صفات تعداد جوانه به کل جوانه ($P\leq0.01$) و تعداد جوانه به برگ ($P\leq0.01$) داشته است. سطوح مختلف هورمون BA تأثیر معنی‌داری روی صفت تعداد برگ نداشته‌اند. همان طوری که از جدول ۱ مشخص است صفت تعداد جوانه و نیز تعداد جوانه به برگ متأثر از ژنوتیپ بوده است چنانکه اثر متقابل ژنوتیپ و هورمون BA در سطح ٪۱ برای هر دو صفت تعداد جوانه برگ و تعداد جوانه به کل جوانه معنی‌دار شده‌اند.

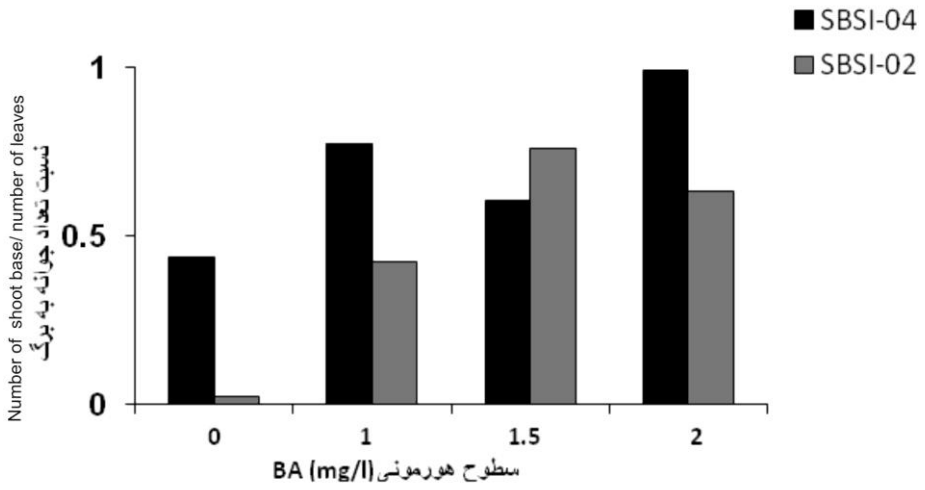
جدول۱: تجزیه واریانس صفت تعداد جوانه‌های گیاهچه به تعداد کل جوانه‌ها، تعداد برگ و تعداد جوانه به برگ

Table 1: Analysis of variance for the number of soot base seedling to the total number of shoots, number of leaves and shoot base

منبع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)		
		برگ Leaf	تعدادجوانه به برگ Number of shoot base/ number of leaves	تعداد جوانه به کل جوانه Number shoot base /Total shoot base
BA	3	0.09^{ns}	2.01^{**}	1.05^{**}
NAA	3	0.05^{ns}	0.13^{ns}	0.06^{ns}
BA×NAA	9	0.12^{ns}	0.087^{ns}	0.04^{ns}
لاین	1	0.11^{ns}	1.87^{**}	0.01^{ns}
BA×لاین	3	0.02^{ns}	0.57^{**}	0.26^{**}
NAA×لاین	3	0.06^{ns}	0.14^{ns}	0.05^{ns}
BA×NAA×لاین	9	0.13^{ns}	0.06^{ns}	0.03^{ns}
خطا	26	64.21	0.08	0.03

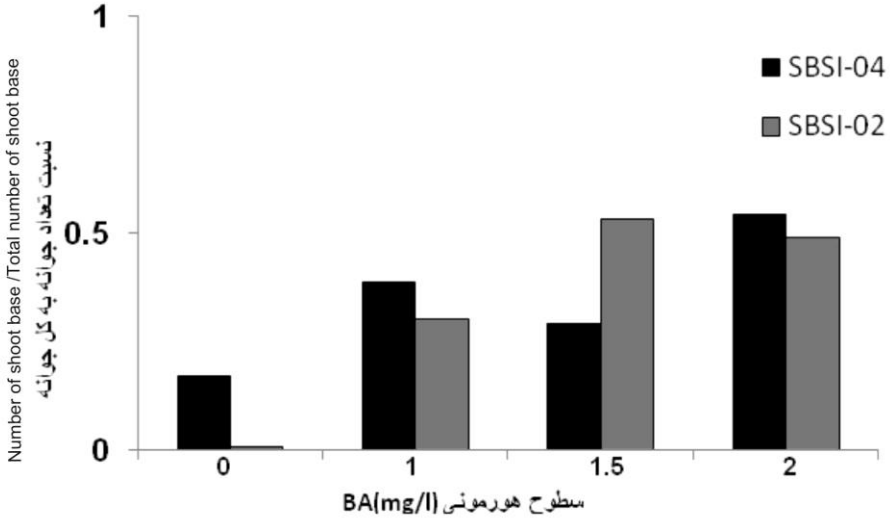
ns و**: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱ درصد

با افزایش میزان BA از صفر به ۲ میلی‌گرم در لیتر، افزایش معنی‌داری در تعداد جوانه به کل برگ مشاهده شد (شکل۱). لاین SBSI-04 در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BA درصد تعداد جوانه نسبت به برگ بیشتری تولید نمود. به‌طور کلی نتایج حاصل از اثر متقابل هورمون BA با لاین نشان می‌دهد که کمترین تعداد جوانه به برگ مربوط به لاین SBSI-02 در محیط بدون هورمون BA بود. همچنین در لاین SBSI-02 بیشترین تعداد جوانه نسبت به برگ در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BA حاصل شد (شکل۱).



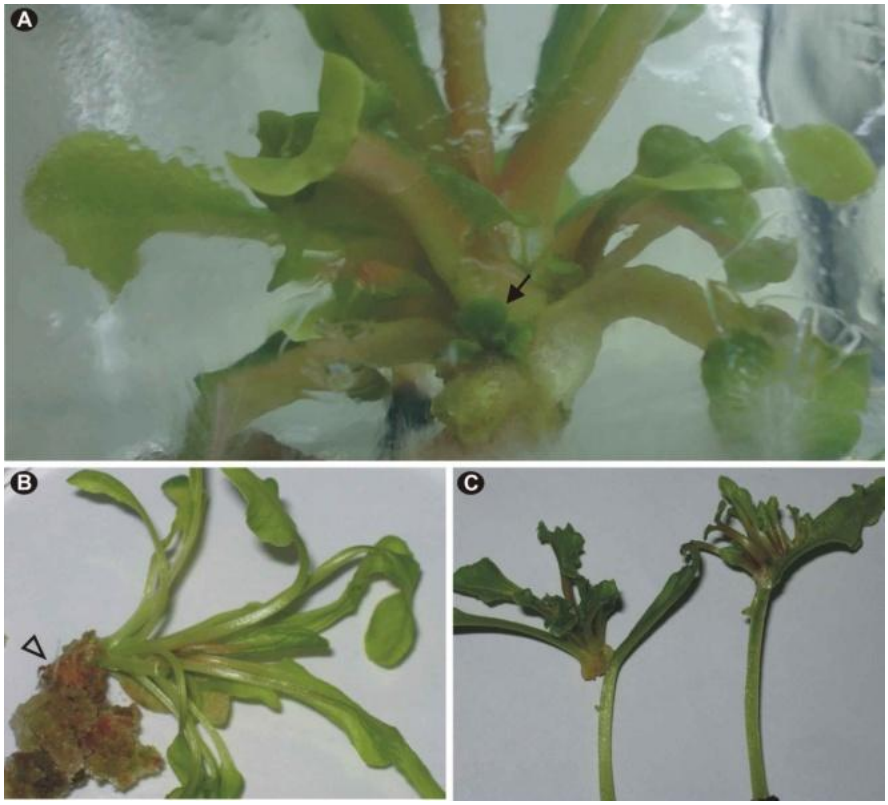
شکل ۱: اثر متقابل لاین× BA بر نسبت تعداد جوانه به برگ
Fig. 1: The effect of BA × line on the number of shoot base to leaves

در مورد صفت تعداد جوانه به کل جوانه، بیشترین میزان تعداد جوانه مربوط به لاین SBSI-04 در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و به همراه لاین SBSI-02 در سطوح ۲ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BA بود. کمترین درصد جوانه مربوط به لاین SBSI-02 و در عدم‌حضور BA مشاهده گردید (شکل ۲). به‌طورکلی لاین SBSI-04 بیشترین قابلیت القاء جوانه بر روی برگ را نشان داد.



شکل ۲: اثر متقابل لاین×BA بر نسبت جوانه به کل جوانه
Fig. 2: The effect of line × BA on the ratio of number shoot base to total number of shoot base

همچنین در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BA، تولید ساقه و برگ‌ها در محل اتصال دمبرگ به ساقه اصلی در لاین SBSI-04 مشاهده شد، این در حالی است که این موضوع در لاین SBSI-02 به نسبت کمتر مشاهده شد (شکل ۳A). در هر دو لاین با افزایش غلظت هورمون‌های BA و NAA (هر دو با ۲ میلی‌گرم در لیتر) در انتهای ساقه حالت غیرطبیعی به صورت متورم و نیز به شکل اندام‌های کالوس مانند مشاهده گردید (شکل ۳B).



شکل۳: تشکیل برگ و ساقه‌های جدید در انتهای دمبرگ B) غلظت بالای (۲mg/l) هورمون‌های BA و NAA C) کشت بافت ریزنمونه‌ی برگ منجر به تشکیل تعدادی جوانه روی رگبرگ اصلی و بین ناحیه برگ و دمبرگ شد

Fig. 3: A) Formation of new stem and leaves at the end of petiole B) High concentrations (2mg/L) of BA and NAA hormones C) Tissue-cultured leaf explant producing numerous shoots regenerated from the cells around the main vein of petiole and leaf blade

بحث

مطالعات در زمینه کشت سلول و بافت چغندرقند نشان می‌دهد که باززایی مستقیم جوانه به عواملی همچون ژنوتیپ، ترکیبات هورمونی و نوع ریزنمونه بستگی مستقیم دارد (Coumans-Gilles *et al.*, 1981; Gosak and Szota, 1992; Jianfeny *et al.*, 1997; Mikami *et al.*, 1985; Sabir and Ford-lioyd, 1991) متغیر بودن ژنوتیپ در چغندرقند به‌دلیل وجود دگرگشنی طبیعی و هتروزیگوسی یک مسئله جدی برای باززایی (Gurel, 1997; Gurel *et al.*, 2001; Gurel *et al.*, 2003) و تراریختی است (Lindsey and Gallois, 1990; D'Halluin *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1994; Mannerlof *et al.*, 1997; Zakharchenko *et al.*, 2000; Hisano *et al.*, 2004) باززایی مستقیم سودمندتر از باززایی غیرمستقیم است زیرا گیاهان حاصل از این روش دارای ثبات ژنتیکی بالایی هستند (Hussey and Hepher, 1978; Atanassov, 1980; Detrez *et al.*, 1988, 1989; Mikami *et al.*, 1989a) و همچنین تولید گیاهان تراریخته کمتر به ژنوتیپ بستگی دارد (Detrez *et al.*, 1988, 1989; Jacq *et al.*, 1992) بافت چغندرقند، زمانی که در محیط همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد قرار دارد به سرعت تولید کالوس می‌کند اما کارآیی باززایی آن پایین است (Welander, 1974, 1976; De Greef, 1978; Saunders and Doley, 1986; Saunders and shin, 1986; Krens and Jamar, 1989; Catlin, 1990). باززایی غیرمستقیم طاقت‌فرسا است و معمولاً فراوانی باززایی کم و با توجه به زیرکشت‌های مختلف تحت ترکیبات محیط‌کشت مختلف در طول باززایی، باعث ایجاد گیاهان غیرطبیعی از نظر صفات مورفولوژی و ژنتیکی می‌شود (Norouzi *et al.*, 2005; Ivic-Haymes and Smigocki, 2005a; Hisano *et al.*, 2004). ترکیبات هورمونی از مواردی است که در باززایی مستقیم نقش دارد، بر همین اساس *میشوتکینا* و همکاران (Mishutkina *et al.*, 2006) به مطالعه تأثیر هورمون در کارآیی باززایی به روش مستقیم در ریزنمونه‌ی گره کوتیلدون در محیط MS شامل سیتوکینین‌های BAP، کینتین و زاتین (با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱

میلی‌گرم در لیتر) پرداختند. بر اساس نتایج این تحقیق، باززایی مستقیم گره کوتیلدون در محیط‌های شامل BAP (۱ mg/l) و زاتین (۰/۵ mg/l) نسبت به محیط‌های حاوی کینتین کارآیی بالایی نشان داد. همچنین داده‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که در محیط MS همراه با هورمون‌های BAP (۰/۵ mg/l) و NAA (۰/۱ mg/l) بالاترین نرخ باززایی مشاهده گردید. در تحقیق دیگری توسط *کرنز* و همکاران (Krens *et al.*, 1996) روی ریزنمونه گره کوتیلدون و تأثیر اکسین در تمایز مجدد و بهبود کارآیی تراریختی در سیستم‌های گیاهی از 2,4-D و NAA برای باززایی مستقیم استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که هورمون 2,4-D باعث افزایش دوره کشت بافت با داشتن فاز کالوس و سبب ایجاد تنوع سوماکلونی به‌همراه کاهش در تعداد گیاهچه باززایی شده گردید. این در حالی بود که این هورمون باعث افزایش کارآیی تراریختی با مستعد نمودن سلول‌ها گردید. هورمون NAA باعث توانایی تغییر فیزیولوژیکی درون سلولی ریزنمونه و افزایش صلاحیت برای تراریختی بدون کاهش در میزان باززایی شد. در این تحقیق بهترین نتیجه با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA به‌دست آمد.

مقایسه نتایج این مطالعه با تحقیقات دیگر در این زمینه نشان می‌دهد که درصد باززایی و تولید جوانه‌ها به نوع ریزنمونه، ژنوتیپ و پیش کشت گیاهچه در محیط‌کشت حاوی هورمون‌های NAA و BA بستگی دارد. همچنین در این مطالعه، از دو محیط القا جوانه استفاده شده است که محیط اول حاوی هورمون‌های BA و NAA، فرآیند تمایز بافتی را تحریک و نیز غلظت بالای سیتوکینین جوانه‌زایی مستقیم را تشدید می‌کند در حالی‌که در محیط کشت القا دوم با ترکیب هورمونی BA (۰/۲۵ mg/l)، IBA (۰/۱ mg/l) به مدت ۳ هفته، شرایط مساعد را برای ایجاد جوانه‌های زیادی در روی پهنک برگ به‌خصوص در اطراف رگبرگ اصلی فراهم نمود. این نوع فیتوهورمون برای ریخت‌زایی از ریزنمونه‌ی برگ چغندرقند توسط *هیسانو* و همکاران (Hisano *et al.*, 2004) و همچنین *نوروزی* و همکاران (2005) مناسب تشخیص داده شده بودند. به‌طور کلی و با توجه به نتایج *نوروزی* و همکاران (2002) بافت‌های با تمایز کمتر، پتانسیل بیشتری برای باززایی دارند و می‌توان با استفاده از سیتوکینین‌هایی نظیر BA فرآیند تمایز بافتی را تحریک نمود. همچنین، اکسین‌ها نقش مؤثری در تمایز مجدد و نیز بهبود کارآیی عمل تراریختی در سیستم گیاهی دارند (Sangwan *et al.*, 1992; De Kathen *et al.*, 1995) و به‌طور کلی از اکسین‌ها برای ایجاد تأثیر روی کارآیی انتقال ژن در یک دوره پیش کشت و قبل از تراریختی استفاده می‌شود (Krens *et al.*, 1996). بنابراین پیشنهاد می‌شود در صورت استفاده از لاین‌های SBSI-04 و SBSI-04 در تحقیقات آینده، از غلظت‌های پایین اکسین نظیر NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و یا کمتر) به همراه غلظت بالای سیتوکینین‌ها استفاده شود.

ریزنمونه نیز یکی از عوامل مؤثر در کشت بافت گیاه چغندرقند است. بر حسب نوع ریزنمونه، موقعیت ریزنمونه و شرایط فیزیکی ریزنمونه میزان باززایی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که جوانه‌های رویشی به‌طور عمده روی سطح فوقانی برگ و در نواحی نزدیک به محل اتصال دمبرگ به پهنک و در برخی از نمونه‌ها در اطراف رگبرگ اصلی تشکیل می‌شود (شکل ۳C). این امر با توجه به تحقیقات *نوروزی* و همکاران (2005) نشان می‌دهد که سلول‌های نزدیک رگبرگ اصلی استعداد بیشتری برای تراریختی و باززایی دارند به‌طوری که باززایی با سرعت بالا در ریزنمونه برگ با حضور هورمون‌های BA و NAA سبب شد تا سلول‌های اطراف رگبرگ اصلی در حالت توتی پوتنت قرار گیرند (Norouzi *et al.*, 2005). همچنین طبق نتایج *دترز* و همکاران (Detrez *et al.*, 1988) از ناحیه اتصال پهنک برگ به دمبرگ، رگبرگ اصلی و نیز رگبرگ‌های فرعی منشعب شده از رگبرگ اصلی برای تولید جوانه و باززایی مستقیم، به‌دلیل تولید بیشتر و مستعدتر، نسبت به پهنک برگ و دمبرگ استفاده شده است. یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار بر موفقیت تولید گیاهچه و باززایی، شرایط فیزیکی گیاه است، به‌طوری که بافت‌های جوان‌تر عکس‌العمل بهتری در مقایسه با بافت‌های مسن‌تر نشان می‌دهند (Bhat *et al.*, 1985; Saunders and Shin, 1986; Mikami *et al.*, 1989b; Gurel, 1991; Jacq *et al.*, 1992; Tenning *et al.*, 1992; Gurel and Wren, 1995; Gurel, 1997; Zhang *et al.*, 2001b; Kuykendall *et al.*, 2003). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ریزنمونه‌های برگ حاوی پایه جوانه می‌تواند برای تراریختی چغندرقند مناسب‌تر باشد. دلیل این امر مزیت‌های چون سادگی تهیه، منبع قابل دسترسی و دائمی با قابلیت باززایی بالا برای تهیه ریزنمونه هدف، کاهش زمان لازم برای باززایی جوانه‌ها به دلیل باززایی مستقیم و نیز به حداقل رسیدن تنوع سوماکلونی به‌دلیل نداشتن فاز کالوس و نیز جوان بودن این ریزنمونه باشد.

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۳-۱۶ متن انگلیسی مراجعه شود.